



SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

JÄTS. 1.12.1989

PATENTTIHAKEMUS—PATENTANSÖKAN

[A] TIIVISTELMÄ—SAMMANDRAG

(11)(21) Patenttihakemus-Patentansökan 885496
(51) Kv.lk.⁴/Int.cl.⁴ A 61 L 33/00
(22) Hakemispäivä-Ansökningsdag 25.11.88
(23) Alkupäivä-Löpdag
(41) Tullut julkiseksi-Blivit offentlig 25.11.88
(86) Kv. hakemus-Int.ansökan SE87/00257
(30) Etuoikeus-Prioritet 27.05.86 SE '8602414-8

(71) Hakija/Sökande: *Camurus AB*, Jägershillgatan 15, Malmö, Ruotsi

(72) Keksijät/Uppfinnare: 1. Larsson, Kåre Viktor 2. Bergentz, Sven Erik
3. Lindblad, Bengt Lennart Toreson

(74) Asiamies/Ombud: Berggren

(54) Keksinnön nimitys/Uppfinningens benämning: Verikosketukseen sovellettu tuote, sen valmistusmenetelmä sekä käyttö. Produkt avsedd för kontakt med blod, framställningsförfarande samt användning därav.

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee tuotetta, joka on sovellettu käyttöihin, joissa mainittu tuote on kosketuksissa veren kanssa, erityisesti lääketieteellisiin käyttöihin, joka tuote käsittää substraatin, joka on hepariinin tai hepariinipohjaiseen materiaalin päällystämä. Kyseessä olevan keksinnön yhteydessä ilmenevä uusi piirre on, että hepariini tai hepariinipohjainen materiaali kiinnitetään substraattiin esiadsorboidun lysotsyymiin tai lysotsyymiin johdannaisen muodostaman kerroksen välityksellä. Sidotun hepariinin hyvä tarttuminen ja vaikutukset saadaan aikaan käyttämällä substraatteina metallia tai polymeerimateriaaleja. Mainittu tuote valmistetaan mieluummin esiadsorboidulla lysotsyymillä tai sen johdannaisella vesiliuoksesta sekä, suorittamalla välillä kuivaustoimenpiteitä, asottamalla se alttiiksi hepariinin tai hepariinipohjaisen yhdisteen vesiliuokselle. Keksintö koskee myös yllä mainitun tuotteen lääketieteellisiä käyttöjä.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser en produkt tillämpad för användningar, i vilka nämnda produkt är i kontakt med blod, speciellt för medicinska användningar, vilken produkt omfattar ett substrat belagt med heparin eller heparinbaserat material. Det nya draget i samband med föreliggande uppfinning är, att heparinet eller det heparinbaserade materialet fästas vid substratet via ett preadsorberat skikt av lysozym eller ett derivat därav. God vidfästning och verkan av det bundna heparinet åstadkommes genom att som substrat använda metall eller polymermaterial. Nämnda produkt framställs fördelaktigen genom att preadsorbera lysozym eller derivat därav från en vattenlösnings och utsätta det, utan mellanliggande torkningsoperation, för en vattenlösnings av heparin eller heparinbaserad förening. Uppfinningen avser även medicinsk användning av ovannämnda produkt.

Verikosketukseen sovellettu tuote, sen valmistusmenetelmä sekä käyttö

5 Esillä oleva keksintö koskee materiaalien heparinisointia, jonka tarkoituksena on antaa materiaaleille hepariinikerros, joka estää verikosketuksessa trombosyyttien yhteenliittymisen ja veren proteiinien adsorption. Esillä olevan keksinnön mukainen tuote on erityisesti sovellettu käyttöjä varten, joissa tapahtuu kosketusta
10 veren kanssa, esimerkiksi lääketieteellisiä sovellutuksia varten. On totta, että materiaalin heparinisointimetodiikka yllä mainittua tarkoitusta varten on sinänsä tunnettua, mutta esillä oleva keksintö koskee uutta, vaihtoehtoista menetelmää hepariinin kiinnittämiseksi substraattiin, nimittäin esiadsorboidun kerroksen
15 erityisen, uuden tyyppin välityksellä. Yllä mainitun tuotteen lisäksi esillä oleva keksintö koskee sen valmistusmenetelmää sekä mainitun tuotteen käyttöä lääketieteellisiin sovellutuksiin.

Veren yhteensopivuuden saavuttamiseksi erilaisten materiaalien
20 suhteen, jotka ovat kosketuksissa veren kanssa, eräs tärkeimmistä menetelmistä on ollut heparinisoida kyseessä olevien materiaalien pinta. Pinnalla sijaitseva hepariinikerros estää täten, kuten yllä mainittiin, trombosyyttien adheesion sekä veren proteiinien adsorption. Edelleen hepariinin täytyy olla entsymaattisesti aktiivinen
25 veren hyytymistapahtumassa, joka vaatii spesifisiä edellytyksiä, kuten esimerkiksi molekyylin konformaatiota ja liikkuvuutta suhteessa pintaan.

Heparinisointiin on aiemmin käytetty kahta pääperiaatetta. Ensimmäinen perustuu kolloidiseen saostumiseen, esimerkiksi amfifiilisten amiinien ja hepariinin välisen kovalenttisen sidoksen muodotumiseen. Toinen pääperiaate käyttää hyväksi hepariinin mahdollisuutta sitoutua kovalenttisesti pintaan. Näillä tunnetuilla periaatteilla on kuitenkin joitakin rajoituksia, mikä merkitsee sitä,
35 että jatkuvasti suoritetaan tutkimusta heparinisoinnin vaihtoehtoisten tai parannettujen menetelmien puolesta.

Esillä oleva keksintö koskee pintojen heparinisoinnin vaihtoehtoista tai parannettua tekniikkaa, jonka avulla poistetaan tai ainakin

vähennetään aiempiin tekniikoihin liittyneitä rajoituksia samalla parantaen niitä, ainakin tiettyjen käyttötapojen sekä uusien, edullisten ominaisuuksien suhteen, jotka eivät aiemmin käytetyllä tekniikalla olleet saavutettavissa. Tarkemmin sanottuna, on havaittu, että tietyllä proteiinilla, nimittäin lysotsyymillä on odottamatonta affiniteettiä hepariinin suhteen, ja se antaa kauemmin kestävän sitoutumisen substraattipintoihin. Odottamattoman hyvät tulokset, jotka on saatu esillä olevan keksinnön mukaisella proteiinilla, kuvataan alla yksityiskohtaisemmin, mutta ensisijaisesti voidaan mainita, että on saatu erittäin hyvä tarttuminen metallipintoihin, materiaaliin, jonka suhteen aiemmin tunnetuissa menetelmissä on ollut puutteita.

Lysotsyymi on proteiini, jota on veressä alhaisina konsentraatioina. Jo tämä on mielenkiintoinen etu, koska lysotsyymien kautta esillä oleva keksintö perustuu ihmiselimistölle ei vieraan aineen käyttöön. Tämän lisäksi toinen lysotsyymien mielenkiintoinen ominaisuus on sen mikrobienvastaiset ominaisuudet, jotka täten antavat uudelle heparinisoidulle pinnalle mikrobienvastaista aktiivisuutta, joka on varmuustekijä varastoinnissa ja käsittelyssä.

Tarkemmin sanottuna, esillä olevan keksinnön mukaiselle tuotteelle on ominaista, että hepariini tai hepariinipohjainen materiaali kiinnitetään tai sidotaan lysotsyymikerroksen tai sen johdannaisen avulla, joka on esiadsorboitu mainittuun substraattiin.

Kuten yllä on mainittu, esillä olevan keksinnön mukaisen uuden tekniikan on osoitettu toimivan erityisen hyvin metallipintojen suhteen, missä yhteydessä aiemmin tunnetuilla, heparinisoiduilla menetelmillä on osoitettu rajoituksia. Kuitenkin esillä oleva keksintö soveltuu myös muille substraateille, jotka valitaan siten aiemmin tunnettujen tekniikoiden mukaisesti, se on, ensisijaisesti sellaisille substraateille, jotka aiemmin on haluttu heparinisoida, tarkoituksena antaa samat parannetut ominaisuudet sovellutuksissa, joissa ollaan kosketuksissa veren kanssa. Sellaisen materiaalien esimerkkejä ovat polymeerimateriaalit ja lasi. Mitä tulee polymeerimateriaaleihin, olisi huomattava, että on ilmennyt, että esillä oleva keksintö on mielenkiintoinen niin

sanottujen matalaenergisten polymeerimateriaalien yhteydessä, mikä tarkoittaa polymeerimateriaaleja, joita vesi ei liuota, mutta joita orgaaniset materiaalit liuottavat.

5

Mitä tulee termiin "lysotsyymi tai sen johdannainen", olisi ymmärrettävä, että esillä oleva keksintö ei tietenkään rajoitu sinänsä lysotsyymiin, vaan on mahdollista valita sen mikä tahansa johdannainen, joka antaa vastaavat tai samanlaiset ominaisuudet. Sellainen valinta voi perustua esimerkiksi johdannaisen parempaan liukoisuuteen halutussa liuottimessa lysotsyymiin sinänsä verrattuna. Käyttökelpoisten johdannaisten esimerkkeinä voidaan mainita suolat, kuten esimerkiksi kloridisuola. Ennen kaikkea keksintö on tietenkin tarkoitettu kattamaan tapaukset, joissa lysotsyymi on muunnettu

10 molekyylin sisällä asemassa tai kohdassa, joka ei ole suoraan kosketuksissa esillä olevan keksinnön mukaisen vaikutuksen kanssa, esimerkiksi muunnoksen, joka ei muuta haluttuja, esillä olevan keksinnön mukaisia ominaisuuksia.

20 Eikä koskien hepariinia, vaatimus on, että hepariinia sinänsä on käytettävä halutun vaikutuksen saamiseksi. Täten ilmaisen "hepariinipohjainen materiaali" tarkoituksena on kattaa hepariiniyhdisteet, jotka antavat vastaavan tai samanlaisen vaikutuksen, tässä yhteydessä vertailutarkoituksessa viitataan aiempaan tutkimukseen,

25 joka julkaisee useita esimerkkejä hepariiniyhdisteistä. Täten tässä yhteydessä esillä oleva keksintö ei eroa aiemmasta tutkimuksesta.

Ne käytöt, joihin esillä oleva, patenttivaatimuksia esittävä tuote erityisen hyvin soveltuu, valitaan myös aiemman tutkimuksen

30 mukaisesti, mikä tarkoittaa, ettei niitä tarvitse kuvata tässä yhteydessä enempää. Kuitenkin sen seikan kautta, että esillä oleva keksintö antaa ominaisuuksien tai edullisten lisäominaisuuksien parannuksia, lääketieteellinen käyttö tai sovellutukset tulevat vielä mielenkiintoisemmiksi esillä olevan keksinnön kuin aiemman

35 tutkimuksen yhteydessä.

Esillä olevan keksinnön mukaiselle menetelmälle on ominaista, että substraatti on ensin kosketuksissa lysotsyymiin tai sen johdannaisen liuoksen kanssa lysotsyymikerroksen muodostamiseksi, ja sitten

substraatti lysotsyymikerroksensa kanssa saatetaan alttiiksi hepariinille tai hepariinipohjaiselle liuokselle, niin että hepariini tai hepariinipohjainen materiaali liittyy mainittuun lysotsyymikerrokseen.

Kuten usein on pintojen suhteen, jotka on päällystettävä, niiden täytyy olla suhteellisen puhtaita halutun tuloksen saamiseksi. Tämä pitää paikkansa myös esillä olevan keksinnön yhteydessä, erityisesti tapauksessa, jossa metalli on substraattina. Sellaisessa tapauksessa pinnan tulisi olla hyvin puhdas, esimerkiksi muodostua metallista tai metallioksidista. Ihanne tapauksessa tämä tarkoittaa, että pinta tulisi kiillottaa tai puhdistaa niin sanotussa plasmapuhdistajassa ja välittömästi tämän jälkeen siirtää tislattuun veteen. Vaihtoehtoisesti voidaan hyväksyä peräkkäinen pesu lipeässä, hapossa ja tislatussa vedessä. Muovipintojen, erityisesti alhaisenergisten, puhdistus mieluummin tarkoittaa, että materiaali puhdistetaan vedessä puhdistusaineella ja sitten orgaanisessa liuottimessa. Mitä tulee muihin substraatteihin, periaatteessa ne puhdistusmenetelmät, joita aiemmin on käytetty niiden yhteydessä, ovat sopivia.

Substraatin pinnan mainitun pesun jälkeen, jos sitä tarvitaan, substraatti on kosketuksissa lysotsyymiliuoksen kanssa, joka tavallisesti on vesiliuos, ja tislattu vesi on usein edullista puskuriliuokseen verrattuna. Lysotsyymikerroksen muodostamiseksi liuoksen konsentraation tulisi olla ainakin 0,1 painoprosenttia. Yläraja ei ole erityisen kriittinen, mitä tulee haluttuun vaikutukseen, mutta yleensä konsentraatio ei saisi ylittää 10 painoprosenttia, koska muutoin viskositeettivaikutukset häiritsevät menetelmää. Erityisen edullinen lysotsyymin tai sen johdannaisen konsentraatioalue on 0,1-2 painoprosenttia.

Käsittelyn mainitun vaiheen pituuden tulisi olla ainakin 15 minuuttia, esimerkiksi noin 20 minuuttia, koska niin pitkä aika normaalisti tarvitaan lysotsyymin adsorption tasapainoarvon saavuttamiseksi. Kun mainittu tasapaino- tai maksimi-arvo on saavutettu, ei normaalisti ole mitään syytä edelleen pidentää käsittelyaikaa, mikä yleensä tarkoittaa sitä, että käsittelyaika on 15-30 minuuttia.

Lysotsyymiliuoksella suoritettua mainittua käsittelyä jälkeen substraatti tulisi nopeasti huuhtoa vedessä ja sitten saattaa alttiiksi hepariiniliuokselle tai hepariinipohjaiselle liuokselle.

- 5 Täten on ilmennyt, erityisesti metallien yhteydessä, että kuivausta ei tulisi eikä täytyisi suorittaa kahden päällystysvaiheen välillä, optimivaikutuksen saamiseksi.

- Hepariini- tai hepariinipohjainen liuos on mieluummin vesipohjainen. Adsorption vuoksi sen konsentraation tulisi olla 0,05 painoprosentin yläpuolella, erityisesti 0,1 painoprosentin yläpuolella. Tässäkään tapauksessa yläraja ei ole erityisen kriittinen, ja mitään muuta lisävaikutusta tuskin saadaan konsentraatioalueella, joka ylittää noin 5 painoprosenttia. Sientähden yleinen alue on
- 15 0,05-5, erityisesti 0,1-5 painoprosenttia. Kuitenkaan monissa tapauksissa mainittua konsentraation ei tulisi ylittää noin 2 painoprosenttia, koska muutoin viskositeetti aiheuttaa häiriöitä. Täten erityisen edullinen alue on 0,1-2 painoprosenttia. Kuitenkin, mitä tulee hepariinikäsittelyyn, periaatteessa kaikkia aiemmista
- 20 tutkimuksista saatuja kokemuksia voidaan käyttää hyödyksi, esimerkiksi mainittu vaihe pääasiallisesti suoritetaan aiemman tutkimuksen esittämien ohjeiden mukaisesti.

- Alttiiksipanoaika, mitä tulee hepariiniliuokseen tai hepariinipohjaiseen liuokseen, on yleensä ainakin 20 minuuttia, esimerkiksi
- 25 noin 30 minuuttia, kuten esimerkiksi 20-45 minuuttia.

- Mainittua hepariinille suoritettua alttiiksipanon jälkeen substraatti huuhdotaan tislatussa vedessä, minkä jälkeen sen annetaan kuivua
- 30 tai se kuivataan, kun ylimäärä liuosta on valutettu pois. Huuhtomalla tislatussa vedessä ennen mainittua kuivausta hepariinerros voidaan vähentää monomolekulaariseksi kerrokseksi. Kuitenkin useimpien sovellutusten suhteen liuenneen, adsorboitua hepariinin tietty pintaylimäärä on edullinen.

- 35 Molempien, yllä mainittujen pintakäsittelyjen suhteen olisi huomattava, että ne mieluummin suoritetaan huoneenlämpötilassa. Haluttaessa voidaan käyttää vähän korotettua lämpötilaa, jos niin halutaan, mutta yleensä lämpötilan ei tulisi ylittää noin 50 °C:ä, kos-

ka lysotsyymissä voi ilmetä rakenteellisia muutoksia.

Lopuksi esillä oleva keksintö koskee yllä määritellyn tuotteen tai
 5 yllä määritellyllä menetelmällä valmistetun tuotteen käyttöä
 lääketieteellisissä sovellutuksissa, joissa ollaan kosketuksissa
 veren kanssa. Tässä yhteydessä olisi huomattava, että termi "lääke-
 tieteelliset sovellutukset" tulisi tulkita laajassa merkityksessä,
 se on, käyttö ei rajoitu erityisesti vain terapeutisiin käsitte-
 10 lyihin.

Esillä olevaa keksintöä kuvataan edelleen seuraavin esimerkein,
 jotka eivät rajoita keksintöä. Niissä käytetyt prosentit tarkoitta-
 vat painoprosenttia ellei muuten erityisesti mainita.

15

Esimerkki 1

Kaupallisesti saatava lysotsyymi, joka on peräisin siipikarjan mu-
 nanvalkuaisesta, tutkitaan geelielektroforeesin avulla muiden mu-
 nanvalkuaisproteiinien suhteen. Sitten lysotsyymistä poistetaan
 20 suolat dialyysin avulla. Tämän jälkeen valmistetaan lysotsyymien
 0,5-painoprosenttinen liuos tislattuun veteen. Metalliputket
 upotetaan mainitun liuoksen hauteeseen 20 minuutiksi. Mainittuja
 metalliputkia on esipuhdistettu 5 minuutin ajan niin sanotussa
 plasmapuhdistajassa, 665 Pa:n ilmanpaineessa. Ne poistetaan
 25 hauteesta, suihkutetaan tislattulla vedellä ja siirretään välittö-
 mästi hauteeseen, jossa on tislattuun veteen valmistettua 0,1-
 prosenttista hepariiniliuosta. Putket poistetaan hauteesta, niitä
 suihkutetaan nopeasti tislattulla vedellä, ja niiden annetaan kuivua
 steriilissä kammiossa 30 °C:ssa. Tällä tavalla saadaan metalliput-
 30 kia, joissa on hepariinerros, joka on kiinnitetty esiadsorboidun
 lysotsyymikerroksen välityksellä.

Esimerkki 2

Polyetyleenikatetreja pestiin yksiprosenttisessa Triton X100-
 35 liuoksessa ja sitten etanolissa (96 %). Mainitut katetrit upotet-
 tiin 0,1-prosenttiseen lysotsyymiliuokseen, joka oli valmistettu
 tislattuun veteen. Noin 20 minuutin kuluttua ne pantiin tislattua
 vettä sisältävän hauteen läpi, minkä jälkeen ne siirrettiin tislatt-
 tuun veteen valmistettuun 0,1-prosenttiseen hepariiniliuokseen.

30 minuutin kuluttua katetrit pestiin, ja sitten niiden annettiin kuivua, jotta saatiin esillä olevan keksinnön mukaisia tuotteita.

5 Esillä olevan keksinnön mukaisten, heparinisoitujen teräsputkien kliininen tutkimus

On käytetty useita menetelmiä keinotekkoisten aineiden verisuonitukoksia aiheuttavan taipumuksen määrittämiseksi. Aiemmin käytetyt menetelmät tarkoittavat, että teräsputkia sijoitetaan verisuonten sisälle ja että mainittuja putkia inkuboidaan suonissa. Mainittuna inkubointiaikana inkuboidaan veren hyytymisjärjestelmää, tapahtuu proteiinien adsorptiota suoneen sijoitetun putken ulkopinnalle sekä trombosyyttien kiinnittymistä ja mahdollisesti verihyytymien muodostumista suoneen sijoitettuun putkeen. Eläinkokeiden perusteella mainitun metodiikan havaittiin olevan hyvä erityisesti tutkittaessa tukosten muodostumista sekä laskimoissa että valtimoissa.

Tutkittaessa tukosten syntymist taipumusta on myöhemmin pääasiallisesti käytetty menetelmiä, joissa käytetään hyväksi radioisotooppeja. Kuitenkin teräsputkien tukoksia aiheuttavan taipumuksen määrittämiseksi aiemmin käytetty tekniikka, jossa teräsputki asetetaan suonen sisään ja määritetään putken paino ennen inkubointia ja inkuboinnin jälkeen, on paras menetelmä materiaalin tukoksia aiheuttavan taipumuksen määrittämiseksi. Teräsputket, joiden läpimitta oli 4 mm, pi-tuus oli 25 mm ja paksuus oli 0,1 mm, heparinisoitiin yllä esitetyn esimerkin mukaisesti.

Materiaalit ja menetelmät

30 Eläimet: 3 lammasta, paino noin 40 kg. Nukutus: Pentabarbitaalia aluksi 30 mg/kg, sitten jatkuvana infuusiona nopeudella 7,5 mg/min. Lampaille asetettiin kurkkuputket, hengityskojetta hapetettiin 40 %:lla happea, hengityksen taajuus oli 20/minuutti, tilavuus oli 10 l/minuutti. Tutkimuksessa käytettiin molempia päävaltimoita, jotka avattiin pienellä, pitkänomaisella leikkauksella, johon sijoitettiin 25 mm:n mittainen teräsputki, joka kavennettiin ja hiottiin. Toiselle puolelle päävaltimeen sijoitettiin heparinisoitu putki ja toiseen sijoitettiin heparinisoimaton putki. Eri inkubointien välillä puolia vaihdettiin. Kokeilutestien jälkeen

inkubointiajaksi valittiin 15 minuuttia.

Tulokset

- 5 Suoritettiin 25 inkubointijaksoa. Näissä kaikissa tukosten painot olivat paljon vähemmän heparinisoidussa kuin heparinisoimattomassa putkessa ($32 + 4$ mg verrattuna $210 + 10$ mg:aan). Tämän lisäksi seitsemässä tapauksessa suonessa oli muita hyytymämassoja, kun teräspanki poistettiin. Kaikki nämä hyytymämassat olivat heparinisoimattomissa putkissa (painot 96, 201, 143, 369, 374, 216 ja 199 mg).

- Tilastollinen laskenta Studentin parillista t-testiä käyttäen antaa t-arvoksi 9,20, df 25, se merkitsee hyytymän muodostumistaipumuksen merkittävää laskua.

Patenttivaatimukset

1. Tuote, joka on sovellettu käyttöihin, joissa se on kosketuk-
sissa veren kanssa, erityisesti lääketieteellisiin käyttöihin, joka
5 tuote koostuu substraatista, joka on päällystetty hepariinilla
tai hepariinipohjaisella materiaalilla, t u n n e t t u s i i t ä ,
e t t ä hepariini tai hepariinipohjainen materiaali on kiinnitet-
ty substraattiin lysotsyymikerroksen tai sen johdannaisen esimer-
kiksi suolan muodostaman kerroksen avulla, joka on esiadsorboitu
10 mainittuun substraattiin.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen tuote, t u n n e t t u
s i i t ä , e t t ä substraatti on metalli.
- 15 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen tuote, t u n n e t t u
s i i t ä , e t t ä substraatti on polymeerimateriaalia, erity-
sesti niin sanottua alahaisenergistä tyyppiä, se on, joka ei liuke-
ne veteen mutta liukenee orgaanisiin liuottimiin.
- 20 4. Minkä tahansa patenttivaatimusten 1-3 mukaisen tuotteen
valmistusmenetelmä, t u n n e t t u s i i t ä , e t t ä en-
sin substraatti saatetaan kosketuksiin lysotsyymien tai sen johdan-
naisen vesiliuoksen kanssa lysotsyymikerroksen muodostamiseksi ja
sitten, mieluummin vedellä suoritettua huuhtomisen jälkeen, subst-
25 raatti lysotsyymikerroksensa kanssa saatetaan kosketuksiin hepariini-
tai hepariinipohjaisen liuoksen kanssa, mieluummin vesiliuoksen
kanssa, jotta hepariini- tai hepariinipohjainen materiaali tarttuu
lysotsyymikerrokseen.
- 30 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
s i i t ä , e t t ä lysotsyymiliuoksen konsentraatio on 0,1-10
painoprosenttia, mieluummin 0,1-2 painoprosenttia.
6. Kumman tahansa patenttivaatimusten 4 ja 5 mukainen menetel-
35 mä, t u n n e t t u s i i t ä , e t t ä hepariini- tai hepariini-
pohjaisen liuoksen konsentraatio on 0,05-5 painoprosenttia, mie-
luummin 0,1-2 painoprosenttia.
7. Minkä tahansa patenttivaatimusten 4-6 mukainen menetelmä,

t u n n e t t u s i i t ä , e t t ä substraatin ja lysotsyymin tai sen johdannaisen liuoksen ja substraatin välisen kosketuksen pituus on ainakin 15 minuuttia, erityisesti 15-30 minuuttia.

5

8. Minkä tahansa patenttivaatimusten 4-7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u s i i t ä , e t t ä alttiiksipanoaika hepariini- tai hepariinipohjaiselle liuokselle on ainakin 20 minuuttia, erityisesti 20-45 minuuttia.

10

9. Minkä tahansa patenttivaatimusten 4-8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u s i i t ä , e t t ä se suoritetaan ilman lysotsyymin tai sen johdannaisen adsorbointivaiheen ja hepariinin tai hepariinipohjaisen materiaalin adsorbointivaiheen välistä kuivausvaihetta.

20